

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出版

(19) 世界的な特許権  
国際事務局



送付書類:  
— 国際事務局

2文字コード及び他の特許については、定期発行される  
各パターンの表裏に記載されている「コードと特許  
のガイダンスノート」を参照。

WO 03/011911 A1



(43) 国際公開日  
2003年2月13日 (13.02.2003)

(10) 国際公開番号  
PCT WO 03/011911 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/46, A61P 31/02, 35/00,  
37/00, 37/06, C07K 19/00 // A61K 38/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/35

(22) 国際出願日: 2002年7月30日 (03.07.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権主張:  
特許2001-232300 2001年7月31日 (01.07.2001) JP

(71) 出願人 (米国を特許する国に指定国について): 小野  
薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO.,  
LTD.) (JP/JP) 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道  
頓2丁目1番5号 Osaka (JP)

(72) 発明者: および  
(SHIBAYAMA, Shiro) (JP/JP) 〒618-8385 大阪府三

(73) 出願人: および  
(ONO, Tetsuo) (JP/JP) 〒606-0001  
京都府京都市左京区松原大宮町1-9-4 Kyoto (JP)

(74) 代理人: 大塚 邦久 (OHUE, Katsuhiko) 〒103-0013 東京  
都中央区日本橋人形町2丁目2番8号 道口 邦二  
ビル7階 大塚特許事務所 Tokyo (JP)

(84) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BD, BE, BG, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

(84) 指定国 (国外): AR, BO, BR, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HN, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY, NZ, OM,  
PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW,

WO 03/011911 A1

BEST AVAILABLE COPY  
This page blank (uspto)

## 明 細 書

PD-1 に対し特異性を有する物質

## 5 技術分野

本発明は、PD-1 を認識する物質、PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質に関する。

## 背景技術

10 免疫システムは多様な外来抗原に対し応答できる機構を獲得した。その機構とは T 細胞、B 細胞において V (D) J 断片の組替えにより抗原レセプターの多様性をもたらすものである。この機構は同時に自己反応性リンパ球を産出する結果となったが、これら自己反応性リンパ球は脳腫や骨髄における負の選択によって除かれ、更に末梢においてもクローン除去やアナジーとい

15 う自己免疫寛容機構により制御されている。

自己免疫疾患は、自己免疫寛容の破綻により発症すると考えられるが、その発症機序の解明に向けて様々な疾患モデルマウスを用いた研究がなされてきた。しかし、自己免疫疾患の病因学的解明や自己免疫寛容の分子機構に関しては依然不明な点が多い。このような状況において、単一遺伝子欠損にて自己免疫疾患を発症するマウスの存在は、分子生物学的な観点から病因学的考察を円く上極めて重要である。致死性全身性リンパ球浸潤を起す CTLA-4- / マウス (Watchhouse, P. et al. Science 270:985~988, 1995; Tivol, E.A. et al. Immunity, 3: 541~547, 1995) SHP-1 欠損 mouse (Shultz, L.D. et al. Cell, 73: 1445~1454, 1993), TGF- $\beta$ -1 ノックアウトマウス (Shull, M.M. et al. Nature, 359: 693~698, 1992) や、糸球体腎炎を発症する Lyn- / マウス (Hobbs, M.L. et al. Cell, 83: 301~311, 1995)、及び FCRIIB- / マウス (Bolland, S. &

Ravech, J.V. Immunity, 13: 277~285, 2000) 等はその代表であり、これらの分子と自己免疫寛容との関連が研究されている。

PD-1 は免疫グロブリンファミリーに属する 55 kD の I 型膜タンパクである。マウス PD-1 とヒト PD-1 は共に 288 個のアミノ酸からなり、5 N 末端のシグナルペプチド (20 アミノ酸) と中間部位に細胞膜貫通領域である疎水性領域を有する (The EMBO J., vol. 11(11), 3887~3895 (1992); 特開平 5-336973 号; EMBL/GenBank/DBJ Acc. No. X 67914, Genomics 23:704 (1994); 特開平 7-291996 号 (米国特許第 5629204 号))。

PD-1 の発現は、胸腺細胞においては CD4-CD8- から CD4+CD8+ 細胞に分化する際に認められる (Nishimura, H. et al. Int. Immunol., 8:773~780, 1996; Nishimura, H. et al. J. Exp. Med., 191: 891~898, 2000)。また、末梢において PD-1 の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化した T 細胞、B 細胞 (Agata, Y. et al. Int. Immunol., 8: 765~772, 1996) 及び活性化マクロファージを含む骨髄細胞に認められる。

15 PD-1 は、その細胞内領域に ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を有し、従って免疫反応における負の制御因子と考えられる。PD-1 欠損マウスにおいて糸球体腎炎、関節炎といったループス様自己免疫疾患 (C57BL/6 遺伝子背景) (Nishimura, H. et al. Int. Immunol., 10: 1563~1572, 1998; Nishimura, H. et al. Immunity, 11: 141~151, 1999) や、拡張性心筋症様疾患 (BALB/c 遺伝子背景) (Nishimura, H. et al. Science, 291: 319~322, 2001) を発症することから、PD-1 が自己免疫疾患発症の、特に末梢自己免疫寛容の制御因子であることが明らかとなった。

## 発明の開示

25 PD-1 は様々な自己免疫疾患の制御因子であり、自己免疫疾患の原因遺伝子の一つであると考えられる。PD-1 の機能を制御することにより、免

疫機能の低下または亢進、感染症、移植時の拒絶反応、腫瘍等の治療や診断を行えると考えて、鋭意検討を重ねた結果本発明者らはP D-1の機能を抑制する物質に係る本発明に到達した。

- 5 免疫を司るリンパ球への刺激は主にT細胞の場合T細胞受容体(TCR)を、B細胞の場合B細胞受容体(BCR)を介し伝わり、その分子機構には細胞内リン酸化反応が重要な役割を担っている。

- 10 P D-1が免疫系においてリンパ球や骨髓系細胞等様々な免疫担当細胞を共に制御していることが明らかとなり、またP D-1の細胞内領域にITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を有することから、本発明者らは、P D-1の抑制性シグナル伝達における分子機構は酪リン酸化酵素のリクルートと考えた。従って、TCRやBCRの近傍にP D-1を位置させることによって、P D-1の機能を発現させることができると考えるに至った。本発明者らは、P D-1とTCRあるいはBCRを架橋した物質によってP D-1の抑制性シグナルが伝わることを確認し、本発明を完成した。
- 15 本発明者らは、まず抗P D-1抗体と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体を用いて上記の考えが正しいことを確認した。CD3とはT細胞に発現する膜タンパクであり、TCRを構成する複合体の一つである。抗P D-1抗体と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体を架橋し、2価抗体を作製した。本発明では、この2価抗体をハイブリッド抗体と呼ぶ。本ハイブリッド抗体は、本発明者により初めて作製されたものである。

20 また、この本ハイブリッド抗体で2種の受容体を架橋することによりシグナルが伝達するとの知見も、今回初めて得られたものである。

すなわち本発明は、

- 25 1. P D-1を認識する物質、P D-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質、  
2. P D-1を認識する物質、P D-1が発現している細胞膜に存在する膜

タンパクを認識する物質およびリンカーからなる2価物質である前記1記載の物質、

3. 膜タンパクが、T細胞膜またはB細胞膜に存在するタンパクである前記1または2に記載の物質、
- 5 4. P D-1を認識する物質、T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質およびリンカーからなる前記1または2に記載の物質、
5. P D-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々2から5量体である前記1乃至4のいずれかに記載の物質、
- 10 6. P D-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が抗体である前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
7. P D-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が、抗体のFab部分である前記6のいずれかに記載の物質、
8. リンカーが有機化合物からなる前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
- 15 9. リンカーがベンゾチドからなる前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
10. P D-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々ベンゾチドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
11. P D-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む複数のベンゾチドで構成される前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
- 20 12. P D-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、各々ベンゾチドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、
13. 前記1に記載の物質を、P D-1が関与する疾患の治療およびまたは予防に有効な量含有する薬学的組成物、
- 25 14. 疾患が神経変性性疾患、自己免疫疾患、臓器移植片拒絶反応、腫瘍および感染症からなる群から選ばれる疾患である前記13に記載の薬学的組成物、

1 15. 神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マンシャドジェゼ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病からなる群から選ばれる前記 14 に記載の薬学的組成物、および

5 16. 自己免疫疾患が、糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症、糖尿病、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症、糖尿病、潰瘍性関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、膵臓病および橋本病からなる群から選ばれる前記 14 に記載の薬学的組成物に関する。

10 本発明で言う PD-1 を認識する物質とは、特異的に PD-1 を認識する物質であれば良く、例えば、抗 PD-1 抗体、抗 PD-1 抗体の断片、PD-1 自体、PD-1 の断片、PD-1 のリガンド (PD-L1 (Freeman, G.J. et al.: J Exp Med., 192: 1027-1034, 2000)、PD-L2、PD-H3)、それらの断片、低分子有機化合物等が挙げられる。

15 より具体的には、2001 年 5 月 30 日付で日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに第 FERM P-18356 号として寄託され、2002 年 7 月 16 日付で、国際寄託番号 FERM BP-8118 として国際寄託に移管されている「J43」と命名したハイブリドーマが産生する抗 PD-1 抗体である。

20 好ましくは、この抗体の Fab 部分であるが、これに限定されるものではない。

本発明で言う PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質とは、特異的にその膜タンパクを認識する物質であれば良く、例えば、T 細胞上に発現する T 細胞受容体 (TCR) を構成する複合体 (TCR 複合体) 等、B 細胞上に発現する B 細胞受容体 (BCR) を構成する複合体 (BCR 複合体) 等を特異的に認識する物質を意味し、例えば、TCR 複合

体を構成するタンパクの断片、抗 TCR 抗体、抗 TCR 抗体の断片、BCR 複合体を構成するタンパクの断片、抗 BCR 抗体、抗 BCR 抗体の断片等が挙げられる。

5 好ましくは、抗 TCR 抗体の Fab 部分、抗 BCR 抗体の Fab 部分であるが、これに限定されるものではない。

抗 TCR 抗体および抗 BCR 抗体は、市販されているものを使用することができる。例えば、抗 TCR 抗体としては、抗 CD3 抗体 ( $\alpha$ -CD3  $\epsilon$  m Ab, Pharmingen 社製)、抗 BCR 抗体としては、抗 IgG (H+L) がリ

クローナル抗体 (Zymed 社製) が入手可能である。

10 本発明で言うリンカーとは、上記の PD-1 を認識する物質および PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質と適切な距離を保って繋ぐことができるものであれば特に限定されない。より具体的には、ペンチド、アミド等が挙げられる。

15 リンカーは、市販されているものを使用することができ、例えば、フェニレンジアレイミド (Phenylenedimaldimide, Aldrich 社製) が入手可能である。

本発明の主体である PD-1 に対する特異性を有する物質は、例えば以下のようにして作製することができる。

20 PD-1 を特異的に認識する物質として抗体を選び、PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパク (以後、単に膜タンパクと省略する。) を特異的に認識する物質も抗体である物質を本発明では、ハイブリッド抗体と呼ぶ。このハイブリッド抗体の作製法について説明する。

(1) PD-1 あるいは膜タンパクを免疫抗原として、動物に感作し、  
(2) 感作動物の脾細胞と感作動物由来のミエロマ細胞を細胞融合し、  
(3) 得られたハイブリドーマより、感作抗原 (PD-1 あるいは膜タンパク) に対するモノクローナル抗体を産生する細胞をスクリーニングし、  
(4) 目的とする抗体産生ハイブリドーマをクローニングし、

- (5) クローニングされた抗体産生ハイブリドーマを増殖させ、
- (6) 産生された抗体を分離精製し、
- (7) 得られた抗PD-1抗体と抗原タンパク抗体をリンカーで架橋して作製することができる。

5 あるいは、(8) F (a b')<sub>2</sub>を得るため、更にベンゾン処理をし、分離精製し、

(9) 調製したそれぞれのF (a b')<sub>2</sub>を還元し、分離精製し、

(10) 調製したそれぞれのF a b<sub>SH</sub>をリンカーで架橋して作製することができる。

10 PD-1とPD-1が発現している細胞膜に存在する抗原タンパク (抗原タンパク) をそれぞれ特異的に認識する物質として、両方あるいは片方が低分子有機化合物である場合は、

(11) 上記の方法で作製した抗体を用い、それぞれの抗原であるPD-1あるいは抗原タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することによりその結合を阻害する低分子を見出し、

15 (12) その低分子同士あるいは抗体またはF a bをリンカーによって架橋して作製することができる。

より具体的に各ステップを説明すると以下になる。

(1) 感作の工程では、PD-1あるいは抗原タンパクは感作動物に腹腔内投与あるいはフットパットに投与することが好ましい。また感作動物は、マウス、ラットなどの一般にモノクローナル抗体が得られている動物であれば特に限定されない。抗原の投与量は、例えばマウスの場合、1回につき10〜200μgを投与すれば十分である。

(2) の細胞融合は、(1) で免疫感作した感作動物のうち、抗体価が十分に上昇してきた感作動物の脾臓を摘出し、常法に従って、脾細胞の懸濁液を調製し、次に得られた脾細胞と感作動物由来のミエローマ細胞との混合物に

37℃でポリエチレングリコール (好ましくは、PEG4000) を加えることによって行なわれる。マウスミエローマ細胞にはP3×63Ag8、P3/NS1/1-Ag4-1、SP-2/0-Ag-14など数種類が知られており、いずれも容易に入手可能である。

5 ミエローマ細胞はHAT増地 (ヒポキサンチン、アミノプラインおよびチミジンを含む増地) では生存できないHGPRT (ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ) 欠損細胞株が有用であり、さらにミエローマ細胞自身が抗体を分泌しない細胞株であることが望ましい。好適にはSP-2/0-Ag-14が用いられる。

10 次に、得られた細胞融合の混合物を、低細胞密度で96マイクロエルムプレートに分注し、HAT増地で培養する。1〜2週間の培養で未融合のミエローマ細胞、ミエローマ細胞同志のハイブリドーマ、さらに未融合の脾細胞、脾細胞同志のハイブリドーマは生存条件が満たされなため死滅し、脾細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが増殖してくる。

15 (3) のスクリーニングは、ハイブリドーマ培養上清と固相化した抗原を反応させ、抗原に特異的に吸着した上清中の抗体を、標識された第2抗体を用いて定量することによって、PD-1あるいは抗原タンパクに対する抗体を産生しているハイブリドーマを判定する。

(4) の工程は、抗体産生ハイブリドーマを単クローナル培養法 (Monoclonal Antibodies, 372 (1980)) に従ってクローニングすることによって行なわれる。この際、限界希釈法を用いることも可能である。

(5) の工程は、クローニングされたハイブリドーマを通常の増地で培養し、その培養上清から分離精製することにより得られるが、より大量の抗体を効率よく得るにはハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、増殖させ、その腹水中より分離精製する方法が用いられる。

(6) の工程は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、

ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できるが、より効果的にはプロテインA-セファロースCL-4B（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いたアフィニティークロマトグラフィーが用いられる。

5 本発明のハイブリッド抗体は、PD-1を特異的に認識するので、PD-1の精製および糖鎖、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどを利用することができる。

(7)の工程は、架橋剤として、例えばスルフォ-EMCS（N-(6-マレイミドカプロキジ)スルホオキシニミドナトリウム塩）を抗体のアミド基またはSH（メルカプト）基に結合させることで架橋できる。どちらか一方の抗体をまず sulfo-EMCS とアミドカップリング結合させ、未反応の sulfo-EMCS をゲルろ過で分離し、2-メルカプトエチルアミンなどで還元した他方の抗体のSH（メルカプト）基と最初の抗体に結合した sulfo-EMCS のマレイミド基を反応させ、ゲルろ過で2種の抗体同士が架橋されたものを分離する。

(8)の工程は、行程(6)で得られたそれぞれの抗体にペプシンを加え、37℃で48時間消化する。ペプシン消化されたF(a b')<sub>2</sub>の分離精製には、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いたゲルろ過が用いられる。

(9)の工程は、F(a b')<sub>2</sub>に2-メルカプトエタノールを加え、30℃で30分間還元する。還元されたF(a b<sub>SH</sub>)<sub>2</sub>の分離精製には、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200を用いたゲルろ過が用いられる。

(10)の工程は、一方の抗体のF(a b<sub>SH</sub>)<sub>2</sub>画分にリンカーを結合させる。架橋剤としてF(a b<sub>SH</sub>)<sub>2</sub>のメルカプト（SH）基に結合できるものであれば良く、例えばフェニレンジマレイミドを加え、室温で30分間反応させる。次に、他方のF(a b<sub>SH</sub>)<sub>2</sub>を1.3倍量加え、室温で4時間反応させる。得られる2種の異なる性質を有する物質の分離精製は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS-200を用いたゲルろ過が用いられる。

(11)の工程は、工程(6)で得られた抗体をそのまま用いるか、常法により適当に標識（例えばビオチン化標識、FITC標識等）して用いることができる。ELISA法を用いる場合は、常法により抗原を固相化し、抗体を添加する。次に酵素標識した2次抗体、ビオチン化標識した抗体を用いる場合は、酵素標識したストレプトアビジンを添加した後、抗体と抗原との特異的結合を、クロモフォール産生物質存在下で吸光度計により測定する。このアッセイ系を用いることによって、PD-1あるいは膜タンパクを特異的に認識する低分子が得られる。

(12)の工程は、片方が抗体あるいはF(a b)である場合、得られた低分子に適当な官能基を導入することで、抗体あるいはF(a b)と結合させることができる。例えば、マレイミド基を導入すれば、抗体あるいはF(a b)のメルカプト（SH）基に結合させることが可能である。また、低分子同士であれば、両物質を含む分子を合成することが可能である。

PD-1を特異的に認識する物質として抗体を、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを特異的に認識する物質としても抗体を選び、これらをつつのペプチド中に含有する物質を本発明では、バイスベシフィック抗体と呼ぶ。このバイスベシフィック抗体の作製法について説明する。

(1) 抗PD-1抗体および抗膜タンパク抗体産生ハイブリドーマから抗体

遺伝子を単離し、

(2) 抗P D-1抗体遺伝子の可変領域と抗膜タンパク抗体遺伝子の可変領域をリソナーDNAを用いて連結し、連結したDNA断片を発現ベクターに組み込み、細胞に発現ベクターを導入して増殖させ、

5 (3) 産生されたタンパクを分離精製してバインディング抗体を作製することができる。

より具体的に各ステップを説明すると以下のようになる。

(1) の工程は、ハイブリドーマ細胞からRNAを単離し、抗体遺伝子またはその部分ベクターをコードするcDNAを単離する工程からなる。

10 ハイブリドーマ細胞から全RNA (total RNA) またはmRNAを単離する工程は、公知の方法 (以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. R.および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) または Current Protocol in Molecular Biology (F.M.Ausubel ら編、John Wiley & Sons, Inc.より発刊)に記載の方法) に従って行うことができる。

15 本発明の抗体遺伝子またはその部分ベクターをコードするcDNAのクローニング的手段としては、本発明の抗体タンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCR法と略称する。) によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだcDNAを本発明の抗体タンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は公知の方法に従って行うことができる。抗体遺伝子は、全RNA (total RNA) またはmRNAを用いて直接、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; 以下、RT-PCR法と略称する。) によって増幅することもできる。

(2) 本発明のバインディング抗体を取得する方法としては、  
i) ベクター合成する方法、または

ii) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的にはii) に記載した方法が好ましい。

5 遺伝子組み換え技術を用いてベクターを生産するための発現系 (宿主ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、例えば、配列番号28で示される塩基配列の5'末端に開始コドン (ATG) を付加し、得られたDNAを、適当なプロモーター (例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λ PLプロモーター、T7プロモーター等) の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター (例えば、pBR322、pUC18、pUC19等) に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌 (例えば、E. Coli DH1、  
15 E. Coli JM109、E. Coli HB101株等) を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするベクターを得ることができる。また、バクテリアのシグナルベクター (例えば、pelBのシグナルベクター) を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするベクターを分泌することもできる。さらに、他のベクターとのフュージョン・フュージョン (fusion protein) を生産することもできる。

20 また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号28で示される塩基配列を適当なベクター (例えば、レトロウイルスベクター、パピローウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等) 中の適当なプロモーター (例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等) の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞 (例えば、

サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞、293T細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その培養液中に目的とするペプチドが分泌される。

- 大腸菌を形質変換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), vol. 69, 2110 (1972)や Gene, vol. 17, 107 (1982)などに記載の方法に従って行うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263 (秀潤社より1993年に発行)や Virology, vol. 52, 456 (1973)などに記載の方法に従って行うことができる。

- 遺伝子組み換え技術を用いて直接バイスベシフィック抗体を作製する技術が知られている。例えば、Altら、FEBS Letter, vol. 454, 90 (1999)によって、癌胎児抗原および大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対するバイスベシフィック抗体(シングルチェーンダイアボディーと呼ばれる。)の作製が報告されている。該断片は同一鎖上の2つの連続したドメイン間で対合するには短すぎる。リンカーによって一方の重鎖可変ドメイン(VH)と他方の軽鎖可変ドメイン(VL)が連結されている。そのため、該断片のVHおよびVLドメインは、別の断片の相補的VLおよびVHドメインと対合することを余儀なくされ、それにより2つの抗原結合部位を形成する。

- ペプチドリinkerは3-12アミノ酸残基が好ましいが、配列は特に限定されない(Hudsonら、J. Immunol. Met., vol. 231, 177 (1999))。

(3) 以上のようにして得られたペプチドは、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できる。

- 本発明のバイスベシフィック抗体もまた、PD-1を特異的に認識するの  
で、PD-1の精製および濃縮、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどに利用することができる。

産業上の利用可能性

[医薬品への適用]

本発明のPD-1に対し特異性を有する物質の最大かつ重要な利用方法は下記の疾患の治療に用いることである。

- 5 本発明のPD-1に対し特異性を有する物質は、例えば、神経変性疾患(パーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マシヤドジェフ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病等)等の疾患の治療および/または予防に有用である。

- また、本発明のPD-1に対し特異性を有する物質は、PD-1が関与し、免疫反応が亢進することによる疾患、例えば、自己免疫疾患(糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症候群、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾眼、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結核性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ペーチェット病、橋本病等)、臓器移植片拒絶反応、アレルギー等の疾患の治療および/または予防に有用である。

また、本発明のPD-1に対し特異性を有する物質は、PD-1が関与し、免疫反応が低下することによって引き起こされる疾患、例えば、腫瘍、感染症等の疾患の治療および/または予防に有用である。

- 20 本発明のPD-1に対する特異性を有する物質を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、1回につき、0.1 mgから100 mgの範囲で、1日1回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、1回につき、0.01 mgから30 mgの範囲で、1日1回から数回非経口投与(好ましくは、静脈内投与)されるか、または1日1時間から24時間の範囲で静脈



内に待設投与される。

もちろん前記のように、投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

- 5 本発明化合物を投与する際には、腔口投与のための内服固形剤、内服液剤、および非腔口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

腔口投与のための内服固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

- 10 このような内服固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質がそのまま、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（微細なグリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。
- 20 腔口投与のための内服液剤は、薬剤的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、懸濁剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含むしていてもよい。

非腔口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を含む。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造、調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

- 10 非腔口投与のための、その他の製剤としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含む、常法により処方される外用液剤、軟膏剤、塗布剤、吸入剤、スプレー剤、坐剤および腔内投与のためのベシラリー等が含まれる。

- 15 スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第 2,868,691 号および同第 3,095,355 号に詳しく記載されている。

- 20 P D-1 は、免疫反応に関与していることから、本発明の P D-1 に対する特異性を有する物質を用いて、P D-1 の発現を測定することによって、免疫反応に関与する物質のスクリーニング等にも利用することができる。

#### 【発明の効果】

- 25 本発明の P D-1 に対する特異性を有する物質は、P D-1 を認識する物質、P D-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびそれらを標的リンカーからなり、P D-1 および膜タンパクの特異的に

認識し、PD-1シグナルを伝達することができる優れた物質である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗PD-1/抗TCRハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体のFACS解析を

5 示す。

図2は、活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体の効果を示す。

図3は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体による抗BCR抗体刺激に対するIL-2産生抑制効果を示す。

10 図4は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体による抗BCR抗体刺激後のSHP-2動員効果を示す。

図5は、J43-2C11 バイスベジフイック抗体発現プラスミド J43-2C11scDb-pSecHygro Bを示す。

15 図6は、活性化マウス脾臓T細胞のIFN- $\gamma$ 産生に対するJ43-2C11 バイスベジフイック抗体の効果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

20 抗PD-1抗体と抗T細胞受容体抗体をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体、抗PD-1抗体と抗B細胞受容体抗体をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BCRハイブリッド抗体と略記する。また、抗PD-1抗体のF<sub>a</sub>b<sub>SH</sub>画分と抗T細胞受容体F<sub>a</sub>b<sub>SH</sub>画分をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗TCRハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体、抗PD-1抗体のF<sub>a</sub>b<sub>SH</sub>画分と抗B細胞受容体F<sub>a</sub>b<sub>SH</sub>画分をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BC

RハイブリッドF<sub>a</sub>b抗体と略記する。

#### 実施例1

(1) 抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体の調製

5 (1-A) 抗マウスCD3 $\epsilon$ モノクローナル抗体のマレイミド化  
抗マウスCD3 $\epsilon$ モノクローナル抗体をリン酸ナトリウム (0.1M, pH7.0)、NaCl (50mM) で置換した後、200倍量のsulfon-EMCS (同仁化学研究所製) を加え、20℃で1時間反応させた。その後、セファクリルS-300 [リン酸ナトリウム (0.1M, pH7.0)] を用いてゲルろ過を行  
10 い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(1-B) 抗PD-1抗体の還元

マウスPD-1に対するモノクローナル抗体 (国際寄託番号FERMBP-8118として、国際寄託されている「J43」と命名したハイブリドーマが産生す  
15 る。) をリン酸ナトリウム (0.1M, pH6.0) で置換した後、2-メルカプトエチルアミン (終濃度10mM)、EDTA (終濃度1mM) を加え、37℃で90分間還元した。セファクリルS-300 [リン酸ナトリウム (0.1M, pH6.0)、EDTA (1mM)] を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (シングルチェック画分)。ま  
20 た、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(1-C) マレイミド化抗マウスCD3 $\epsilon$ モノクローナル抗体と還元抗PD-1抗体の架橋

マレイミド化抗マウスCD3 $\epsilon$ モノクローナル抗体と還元抗PD-1抗体を1:4の割合で混合し、15℃で18時間反応させた。その後、セファクリルS-300 [リン酸ナトリウム (0.1M, pH7.0)] を用いてゲルろ過を行  
25 い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。また、

同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2) 抗PD-1/抗TCRヘイフリットF a b 抗体の調製

(2-A) 抗PD-1抗体のF (a b')<sub>2</sub>画分の調製

マウスPD-1に対するモノクローナル抗体 (国際寄託番号 FERM BP-8118 として、国際寄託されている「J43」と命名したヘイフリット-マウスが産生する。) をペプシン-ベンゾナー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH4.5)、NaCl (0.1M)] に置換したのち、ペプシン (終濃度 0.2mg/mL) を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルS-200 [Tris-HCl (0.2M, pH8.0)、EDTA (10mM)] を用いてゲルろ過を行った。280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F (a b')<sub>2</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-B) 抗PD-1抗体のF a b<sub>SH</sub>画分の調製

F (a b')<sub>2</sub>画分に2-メルカプトエタノール (終濃度 20mM) を加え、30℃で30分間還元した。氷冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)] を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F a b<sub>SH</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-C) 抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF (a b')<sub>2</sub>画分の調製

抗マウスCD3εモノクローナル抗体 (Pharmingen 社製) をペプシンベンゾナー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH4.5)、NaCl (0.1M)] に置換したのち、ペプシン (終濃度 0.2mg/mL) を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルS-200 [Tris-HCl (0.2M, pH8.0)、EDTA (10mM)] を用いてゲルろ過を行った。280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F (a b')<sub>2</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-D) 抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF a b<sub>SH</sub>画分の調製

F (a b')<sub>2</sub>画分に2-メルカプトエタノール (終濃度 20mM) を加え、30℃で30分間還元した。氷冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)] を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (F a b<sub>SH</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-E) PD-1抗体のF a b<sub>SH</sub>画分と抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF a b<sub>SH</sub>画分の架橋

(2-A)で調製したPD-1に対する抗体のF a b<sub>SH</sub>画分にフェニンジアルイミド (Aldrich 製) (終濃度 4mM) を加え、室温で30分間反応させ、これを「J43 F a b<sub>SH</sub>」画分とした。「J43 F a b<sub>SH</sub>」画分及び抗マウスCD3εモノクローナル抗体のF a b<sub>SH</sub>画分を1:1.3の比で加え、室温で4時間反応させた。次にTris-HCl (1M, pH8.0) を適量加えることで反応溶液のpHを8.0にし、2-メルカプトエタノール (終濃度 20mM) を加え、30℃で30分間反応させた。ヨードアセトアミド (SIGMA 製) (終濃度 25mM) を加え、遮光下、室温で10分間反応させた。

最終的に、セファクリルS-200 [酢酸ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)] を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (B s A b 画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

実施例2: 抗PD-1/抗TCRヘイフリットF a b 抗体の細胞表面抗原 (PD-1及びCD3) に対する反応性の確認

PD-1陽性CD3陰性細胞としてmPD-1/A 2011A1.6、PD-1陰性CD3陽性細胞としてマウス脾臓細胞から調製したナイーブT細胞を用い、1×10<sup>6</sup>個の各細胞を回収し、91μLのFACSベッファ (PBS (-) +0.5%BSA EDTA (2mM) 0.01%NaN<sub>3</sub>) と、5

μLマウス血清、及び4μLのハイブリッド抗体(2μg)を添加し、30分間米上で静止した。PBS(-)で、1回洗浄し、二次抗体をそれぞれ2μL(1μg)添加し、FACSパツプアーで最終的に100μLにフィルアップ(fill up)し、30分間米上で静止した。その後、FACSscanを用いて解析を行った。その結果を図1に示す(なお、以下の図において、ハイブリッドF a b抗体をHFA bと記す。 )。

作製した抗PD-1/抗TCRハイブリッドF a b抗体が実際に細胞表面抗原に反応するかどうかをFACSsort(ベクトンディキンソン製)を用いて、解析した結果、それぞれの表面抗原に反応することを確認できた。

10

実施例3：活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF a b抗体の効果

#### (A) 脾臓T細胞の調製

BALB/cマウスから脾臓を摘出し、赤血球を溶血させた後、PBS(-)で1回洗浄し、培地RPMI1640(10%FCS, antibiotics)に懸濁した( $1 \times 10^6$  cells/mL)。さらに培地により平衡化されたT細胞分離用ナイロンアイバークラム(Wako製)を用いてT細胞の単離調製した。

(B) 活性化脾臓T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドF a b抗体の効果

96wellプレートに $0.5 \mu\text{g/mL}$ 及び $5 \mu\text{g/mL}$ の抗CD3抗体(クローン名KT3、Immuntch製)を37℃で3時間コートする。播種したT細胞( $2 \times 10^5$  cells/well/200μL)に、抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体(0.03、0.1、0.3、1、3μg/100μL)を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内(37℃)で培養した。72時間後に回収した培養上清中のサイトカイン(IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10)の濃度をアッセイキット(R&D system製)を用いて測定した。

21

その結果を図2に示す通りであり、3μgの抗PD-1/抗TCRハイブリッドF a b抗体を用いたときの72時間後において、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 及び5μg/mLのどちらの刺激においてIFN-γ、IL-4、IL-10の産生を低位に抑制するという結果を得た。

5

実施例4：抗PD-1/抗BCRハイブリッドF a b抗体の調製

(A) 抗PD-1抗体のF(a b')<sub>2</sub>画分の調製

マウスPD-1に対するモノクローナル抗体(実施例1で用いたものと同じ抗体)をペプシンパツプアー[酢酸ナトリウム(0.1M, pH4.5)、NaCl(0.1M)]に置換したのち、ペプシン(SIGMA製)(終濃度0.2mg/mL)を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルス-200(AmarshamParnacia製)[Tris-HCl(0.2M, pH8.0)、EDTA(10mM)]を用いてゲルろ過を行った。280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(F(a b')<sub>2</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

15

(B) 抗PD-1抗体のF a b<sub>H</sub>画分の調製

F(a b')<sub>2</sub>画分に2-メルカプトエタノール(終濃度20mM)を加え、30℃で30分間還元した。氷冷したのち、セファクリルス-200[酢酸ナトリウム(50mM, pH6.3)、EDTA(1mM)]を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(F a b<sub>H</sub>画分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

20

(C) 抗IgG(H+L)ポリクローナル抗体のF(a b')<sub>2</sub>画分の調製  
ウサギ抗マウスIgG(H+L)ポリクローナル抗体(Zymed社製)をペプシンパツプアー[酢酸ナトリウム(0.1M, pH4.5)、NaCl(0.1M)]に置換したのち、ペプシン(終濃度0.2mg/mL)を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルス-200[Tris-HCl(0.2M, pH

25

22



ウス (mouse) 1 L-2アッセイキット (R&G system 製) を用いて測定した。  
その結果を図 3 に示す。

抗 PD-1/抗 BCR ハイブリッド F a b 抗体及び抗 BCR 抗体 F (a b')<sub>2</sub> の投与量 (dose) を変えて検討した結果、抗 BCR 抗体 F (a b')<sub>2</sub> の濃度にかかわらず、全ての場合において、ハイブリッド F a b 抗体において抑制効果が見られた。

#### (C) SHP-2 動員の確認

3×10<sup>6</sup> cells/100 μL のマウス PD-1 強制発現 A2011 A1.6 (B 細胞株) に抗 PD-1/抗 BCR ハイブリッド F a b 抗体 (0, 10, 1, 3, 10 μg/100 μL) を加えた。10 分後、抗マウス IgG (H + L) F (a b')<sub>2</sub> (終濃度 0.3, 1, 3 μg/mL) を 100 μL 添加し、5 分間室温で反応させた。遠心して上清を除去した後、細胞を 200 μL のライシス・バッファ (Lysis buffer) (組成: Tris-HCl (20 mM), p H7.4), NaCl (150 mM), Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), 1% Triton-X100, ピロリン酸ナトリウム (2.5 mM), β-グリセリン酸ナトリウム (1 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM), ロイペプチン (1 μg/mL), PMSF (1 mM) ) に懸濁し、氷上に静置した。30 分後、遠心して上清を回収し、20 μL のプロテイン G セファロースビーズ (アマシヤムバイオサイエンス社製) を加え、4℃で 30 分間反応させた。遠心して上清を回収し、あらかじめ抗 FLAG 抗体 (SIGMA 製) を結合させておいたプロテイン G セファロースビーズを 20 μL 添加し、4℃で一晩混和させた。

ビーズを 400 μL のライシス・バッファで 5 回洗浄したのち、20 μL のライシス・バッファ及び 20 μL の 2×SDS サンプルバッファを添加し、100℃で 5 分間煮沸した。遠心によりビーズを除去して、うち 15 μL を 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動する。泳動後、ゲルをブ

ロットリングバッファに置換してから、PVDF 膜 (BIO RAD 製) に転写した。転写後、膜を室温で 1 時間ブロック・エース (Block Ace) (大日本製薬 製) でブロックした。

200 倍に希釈した抗 SHP-2 抗体 (SANTA CRUZ 製) を、室温で 1 時間反応させた後、TBS-T で 10 分間、3 回洗浄した。その後、2000 倍に希釈された HRP 標識抗ラビット (rabbit) Ig 抗体 (アマシヤムバイオサイエンス社製) を室温で 1 時間反応させた後、TBS-T で 10 分間、3 回洗浄した。最終的に ECL プラス・ティデクション・キット (ECL plus detection kit) (アマシヤムバイオサイエンス社製) を用いて発光させ、ルミノイメジャー LAS1000 プラス (plus) (FUJI Film 製) で解析した。

抗 PD-1/抗 BCR ハイブリッド F a b 抗体が、抗 BCR 抗体刺激からの IL-2 産生を抑制するという結果から、その効果が、脱リン酸化酵素 SHP-2 の PD-1 の ITIM への動員によるものかどうかを証明するため、評価を行った。図 4 に示すように、PD-1 の量をコントロールとし、サンプル量を調整し、SHP-2 の動員を定量した結果、コントロールハイブリッド抗体に対し、1 及び 10 μg において、明らかな SHP-2 の動員が確認された。

#### 実施例 6 : 抗マウス PD-1 抗体 J43 の cDNA クローニング

(1) 抗マウス PD-1 抗体 J43 の調製

37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下、抗マウス PD-1 抗体産生ハイブリドーマ (J43) を、Hybridoma SFM 培地 (インビトロジェン製) で培養し、数日後ハイブリドーマの培養上清を回収した。回収した培養上清より、HiTrap Protein G (アマシヤムバイオサイエンス社製) を用いて、IgG 画分を精製した。

(2) ペプチドシークエンス

J43 IgG を 10-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、

泳動後のゲルから 1 g G を P V D F 膜 (ハイオラッド製) に電気的に転写した。転写された膜をクワシー染色し、J 43 I g G 重鎖を含む膜を切り取り、ベンチドシークエンサー-Proceed92 (アプライドバイオシステムズ製) を用いて、重鎖のアミノ末端の配列 15 残基を決定した (配列番号 1)。

### 5 (3) RNA の抽出

5 × 10<sup>6</sup> 個のハイブリドマを 1 mL の TRIzol (インビトロジェン製) で溶解した。以下の操作は添付書に従い、全 RNA (total RNA) を調製した。さらに調製した全 RNA (total RNA) より、Oligotex-MAG mRNA Purification kit (宝酒造製) を用いて、mRNA を精製した。

### 10 (4) 重鎖 cDNA のクローニング (3' RACE)

ベンチドシークエンسにより決定した重鎖のアミノ末端の配列 (YELTQPPSASVNVGE) より精製プライマー (プライマー No.1) を設計した。3'-Full RACE Core Set (宝酒造製) を用いて、以下に示した反応条件により、3' RACE を行った。

15

### プライマー No.1

5'-tat(ct) ggt(atg) atg(gat/gtc) cat(atg) ccg(atg/c) cc-3' (配列番号 2)

### 1) 第 1 鎖 (First strand) cDNA の合成

20	10 × RNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) バッファ	2
	J 43 mRNA (50 ng/μL)	2
	塩化マグネシウム (2.5 mM)	4
	dNTP 混液 (各 1.0 mM)	2
25	AMV 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) XL (5 U/μL)	1
	Oligo dT-3sites Adapter プライマー (2.5 pmol/μL)	1
	リボスクレターゼ (RNase) 阻害剤 (4.0 U/μL)	0.5

dH <sub>2</sub> O	7.5
°	15 μL

30℃ 10分 → 50℃ 30分 → 95℃ 5分 → 4℃ 5分

### 5 2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

第 1 鎖 (First strand) cDNA	1
プライマー No.1 (2.0 pmol/μL)	1
テンカージプライマー	1
dH <sub>2</sub> O	2.2
One shot LA PCR Mix (商品名)	2.5
	5.0 μL

95℃ 5分 → (94℃ 20秒、50℃ 20秒、72℃ 60秒) × 30 サイクル

15

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を 1% アガロースゲル電気泳動後、ゲルを EtBr 染色した。ゲルから DNA 断片を MinElute Gel Extraction Kit (キアゲン製) を用いて回収し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて、回収した DNA 断片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結されたプラスミドを用いて、大腸菌 DH5α を形質転換させた。最終的に、大腸菌よりプラスミドを精製して、J 43 I g G 重鎖 cDNA の塩基配列を決定した (配列番号 3)。cDNA から推定されるアミノ酸配列を配列表に示す (配列番号 4)。

### (5) 重鎖 cDNA のクローニング (5' RACE)

5' RACE を行うために、既報のヘアスティー I g G 重鎖 cDNA 配列情報 (GenBank Accession No. U17166) に基づき、定常領域のプライマーを設計した。5'-Full RACE Core Set (宝酒造製) を用いて、以下に示した反応条件により、5' RACE を行った。

プライマー No.2

5'-ccc aag agg tca gga ggt gga-3' (5' リン酸化処理) (配列番号5)

プライマー No.3

5 5'-tgg acc agg cat ccc agg gtc-3' (配列番号6)

プライマー No.4

5'-ggt aag ctg gaa ctc tgg agc-3' (配列番号7)

プライマー No.5

5'-tgg tgg tgc tgc cac agg cag-3' (配列番号8)

10 プライマー No.6

5'-tgc aca cct tcc cat ctg tcc t-3' (配列番号9)

1) 第1鎖 (First strand) cDNAの合成

J43 全RNA (total RNA) (2  $\mu$ g/ $\mu$ L) 2

15 10 $\times$ RNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) バックアップ 1.5

リボスクレアーゼ (RNase) 阻害剤 (40 U/ $\mu$ L) 0.5

AMV 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) XL (5 U/ $\mu$ L) 1

プライマー No.2 (100 pmol/ $\mu$ L) 2

dH<sub>2</sub>O 8

20 30 $^{\circ}$ C 10分 → 50 $^{\circ}$ C 40分 → 30 $^{\circ}$ C 2分 15  $\mu$ L

2) ハイブリッドRNA (Hybrid RNA) の分解

第一鎖 (First strand) cDNA 15

25 5 $\times$ Hybrid RNA 分解(Degeneration) バックアップ 15

dH<sub>2</sub>O 45

リボスクレアーゼH (RNaseH)

1

76  $\mu$ L

30 $^{\circ}$ C 1時間

反応後、エタノール沈殿を行った。

5

3) ライゲーション (Ligation) 反応による一本鎖cDNAの標化

5 $\times$ RNA(ssDNA) ライゲーション(Ligation)バックアップ 8

40%ポリエチレングリコール (PEG) #6000 20

dH<sub>2</sub>O 12

10 エタノール沈殿のペレット

T4 RNAリガーゼ (ligase) 1

41  $\mu$ L

15 $^{\circ}$ C 15時間

15 4) 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR)

ライゲーション (Ligation) 反応後のサンプル 1

プライマー No.3 (5 pmol/ $\mu$ L) 2

プライマー No.4 (5 pmol/ $\mu$ L) 2

dH<sub>2</sub>O 20

20 One shot LA PCR Mix (商品名) 25

50  $\mu$ L

94 $^{\circ}$ C 3分 → 94 $^{\circ}$ C 30秒、52 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 120秒)  $\times$  25サイクル

5) 第2回ポリメラーゼ連鎖反応 (Second PCR)

25 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) 産物 2

プライマー No.5 (5 pmol/ $\mu$ L) 2



プライマー No.6 (5 pmol/μL)	2
dH <sub>2</sub> O	20
One shot LA PCR Mix (商品名)	25

50 μL

5 94℃ 3分→(94℃ 30秒、52℃ 30秒、72℃ 120秒)×30サイクル

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を1%アガロースゲル電気泳動後、  
ゲルをEtBr染色した。ゲルからDNA断片を MinElute Gel Extraction Kit  
(キアゲン製) を用いて回収し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて、  
10 回収したDNA断片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結さ  
れたプラスミドを用いて、大腸菌DH5αを形質転換させた。最終的に、大  
腸菌よりプラスミドを精製して、1431 gCG重鎖cDNAの塩基配列を決  
定した (配列番号10)。cDNAから推定されるアミノ酸配列を配列表に  
示す (配列番号11)。

15

実施例7: 抗マウスCD3ε抗体のcDNAクローニング

(1) RNAの調製

37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下、抗マウスCD3ε抗体産生ハイブリドーマ  
(145-2C11: Pharmingen 製)を、Hybridoma SFM培地 (インビトロジェン製) で  
20 培養し、数日後5×10<sup>6</sup>個のハイブリドーマを1mLのTRIzol (インビトロ  
ジェン製) で溶解した。以下の操作は添付書に従い、全RNA (total RNA)  
を調製した。

(2) cDNAライブラリーの作製

Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (アモシヤムファルマシア製) を用  
25 いて、ハイブリドーマ(145-2C11)から抽出した全RNA (total RNA) 2.5μ  
gから、オリゴdTプライム法によりcDNAを作製した。操作・手順につ

いては、添付書に従った。

(3) 重鎖および軽鎖のcDNAクローニング

既報の 145-2C11 重鎖可変領域cDNA配列情報 (GenBank Accession  
No.AF000357) に基づき、ハイブリドーマ145-2C11 重鎖可変領域のプライマ  
5 ーNo.7 および No.8 を、また 145-2C11 軽鎖可変領域cDNA配列情報  
(GenBank Accession No.AF000356) に基づき、ハイブリドーマ145-2C11 軽鎖  
可変領域のプライマーNo.9およびNo.10を設計した。ハイブリドーマ145-2C11  
cDNAライブラリーを鋳型とし、これらのプライマーを用いて、PCRを  
行った。

10

プライマー No.7

5'-gag gag cag atg acc cag tta c-3' (配列番号12)

プライマー No.8

5'-aga gag gag ggt gac cat ggt t-3' (配列番号13)

15 プライマー No.9

5'-gac atc cag atg acc cag tta c-3' (配列番号14)

プライマー No.10

5'-ttt ggt ttc cag cat ggt gcc ag-3' (配列番号15)

20

cDNAライブラリー

2

プライマー No.7 または 9 (5 pmol/μL)

2

プライマー No.8 または 10 (5 pmol/μL)

2

dH<sub>2</sub>O

20

One shot LA PCR Mix (商品名)

25

25

(94℃ 30秒、52℃ 30秒、72℃ 120秒) ×30サイクル

50 μL



## 号27)

## フラグメント1、2、3のPCR条件

## 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR)

5	テンプレート (Template) 1	2
	テンプレート (Template) 2	2
	リンカー (100 ng/μL)	2
	リンカー (100 ng/μL)	2
	dH <sub>2</sub> O	17
10	One shot LA PCR Mix (商品名)	25
		50 μL

95℃ 5分 → (94℃ 30秒、40℃ 30秒、72℃ 60秒) × 20サイクル

## 第2回ポリメラーゼ連鎖反応 (Second PCR)

15	第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) 産物	5
	プライマー (5 pmol/μL)	2
	プライマー (5 pmol/μL)	2
	dH <sub>2</sub> O	16
	One shot LA PCR Mix (商品名)	25
		50 μL

20 95℃ 5分 → (94℃ 30秒、50℃ 30秒、72℃ 60秒) × 30サイクル

DNAフラグメント1、2、3とプラスミド pBluescriptII SK(+) (ストラテジー製) をそれぞれ、制限酵素 EcoRI・KpnI、KpnI・SphI、SphI・XhoI、EcoRI・XhoI を用いて消化し、1%アガロース電気泳動を行った後、DNA断片を MinElute Gel Extraction Kit を用いてゲルから精製した。次に、この3個

のフラグメントとプラスミド pBluescriptII SK(+) (ストラテジー製) を DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製) を用いて連結し、連結されたプラスミドを用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。大腸菌よりプラスミド J43-2C11scDb-pBluescriptII SK(+) を調製し、挿入部分の塩基配列を確認した (配列番号28)。

5 塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列図に示す (配列番号29)。

J43-2C11scDb-pBluescriptII SK(+) を制限酵素 BamHI および XhoI で切断し、切断されてきた BamHI-XhoI 断片と BamHI-BamHI 断片のうち、最初に BamHI-XhoI 断片を BamHI および XhoI で切断した哺乳動物細胞発現ベクター-pSecTag2/Hygro B (インビトロジェン製) と連結した。次に BamHI-XhoI 断片と連結した pSecTag2/Hygro B を再び制限酵素 BamHI で切断し、もう一方の BamHI-BamHI 断片と連結した。連結したプラスミドを用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。最終的に、大腸菌よりプラスミド J43-2C11scDb-pSecHygro B を調製し、作製した J43-2C11 バイオベンジイック抗体の塩基配列を確認した (配列番号30)。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表に示す (配列番号31)。

## 実施例9: J43-2C11 バイオベンジイック抗体の発現

6 × 10<sup>6</sup> 個の293T細胞を20mLの培地 (10%ウシ胎児血清を含むDMEM) に懸濁し、TypeIcコラーゲンをコートした150mmディッシュに播種した。翌日、細胞を10mLのDMEMで洗浄した後、LipofectAMINB-plusを用いて J43-2C11scDb-pSecHygro B を遺伝子導入した。3時間後、5mLの40%ウシ胎児血清を含むDMEMを添加した。2日目に細胞を10mLのDMEMで洗浄して新たな20mLのDMEMを添加し、4日目に培養上清を回収した。

25 遠心により細胞を除去後、0.22μm PVDFフィルターを通した。上清を、透析チューブにいれ40% PEG20000 を含むPBS中で透析し、濃縮した。

濃縮した上清を HiTrap chelating HP column(アマシャムファルマシア製)を用いて精製した。さらに、精製度を高めるために HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution(アマシャムファルマシア製)を用いて、ゲルろ過精製した。

# 5 実施例 10: T細胞の活性化の抑制

BALB/c マウスから脾臓を摘出後、脾臓をセルストレイナー (70  $\mu$ m Nylon) を通して細胞を調製した。調製した細胞を遠心して回収後、溶血液 (NH<sub>4</sub>Cl (0.8%), KCO<sub>3</sub> (0.1%), EDTA (1 mM)) を加え、赤血球を溶血させた。その細胞を PBS (-) で1回洗浄後、mouse CD3<sup>+</sup> T cell enrichment column kit(R&D 製)を用いて T細胞を精製し、 $5 \times 10^6$  個/mL の割合で培地 (10% ウシ胎児血清を含む PRNMI640) に懸濁した。

予め  $5 \mu$ g/mL の抗 CD3 抗体 (クローン名 KT3) を 37°C で 3 時間コートした 96 well プレートに、先に調製した T細胞を  $2 \times 10^5$  個/100  $\mu$ L/well の割合で播種し、さらに培地で希釈した J43-2C11 バイスベシフィック抗体 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3  $\mu$ g/100  $\mu$ L) を添加して、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 72 時間培養した。72 時間後、培養上清を回収し上清中の IFN- $\gamma$  の濃度を Quantikine Immunoassay Kit(R&D 製)を用いて定量した。

図 6 に示すように、J43-2C11 バイスベシフィック抗体はインビトロ (in vitro) において活性化させたマウス脾臓 T細胞の産生する IFN- $\gamma$  の量を用意依存的に減少させた。

## 請求の範囲

1. PD-1 を認識する物質、PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質。

5

2. PD-1 を認識する物質、PD-1 が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる 2 価物質である請求の範囲 1 に記載の物質。

10 3. 膜タンパクが、T 細胞膜または B 細胞膜に存在するタンパクである請求の範囲 1 または 2 に記載の物質。

4. PD-1 を認識する物質、T 細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質または B 細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質およびリンカーからなる請求の範囲 1 または 2 に記載の物質。

15

5. PD-1 を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々 2 から 5 量体である請求の範囲 1 乃至 4 のいずれかに記載の物質。

20 6. PD-1 を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が抗体である請求の範囲 1 乃至 5 のいずれかに記載の物質。

7. PD-1 を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは両方が、抗体の Fab 部分である請求の範囲 6 のいずれかに記載の物質。

25

8. リンカーが有機化合物からなる請求の範囲 1 乃至 5 のいずれかに記載の物質。

9. リンカーがベンチドからなる請求の範囲 1乃至5のいずれかに記載の物質。

10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々ベンチドである請求の範囲 1乃至5のいずれかに記載の物質。

11. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む複数のベンチドで構成される請求の範囲 1乃至5のいずれかに記載の物質。

10

12. PD-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、各々ベンチドである請求の範囲 1乃至5のいずれかに記載の物質。

13. 請求の範囲 1に記載の物質を、PD-1が関与する疾患の治療および/または予防に有効な含有する薬学的組成物。

14. 疾患が神経変性疾患、自己免疫疾患、臓器移植片拒絶反応、腫瘍および感染症からなる群から選ばれる疾患である請求の範囲 13に記載の薬学的組成物。

20

15. 神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マジャドジェン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病からなる群から選ばれる請求の範囲 14に記載の薬学的組成物。

25 16. 自己免疫疾患が、糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症様疾患、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性

関節リウマチ、多発性硬化症、乾眼、アレルギー性接触性皮炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ペーチェット病および癌本病からなる群から選ばれる請求の範囲 14に記載の薬学的組成物。

図 1

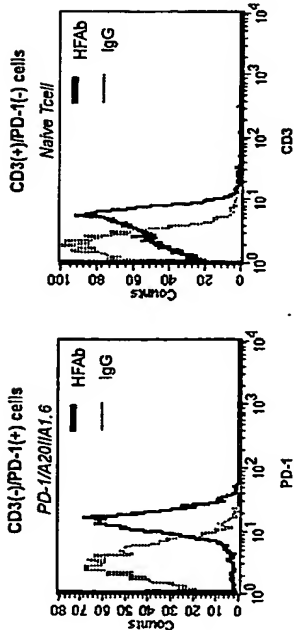


図 2

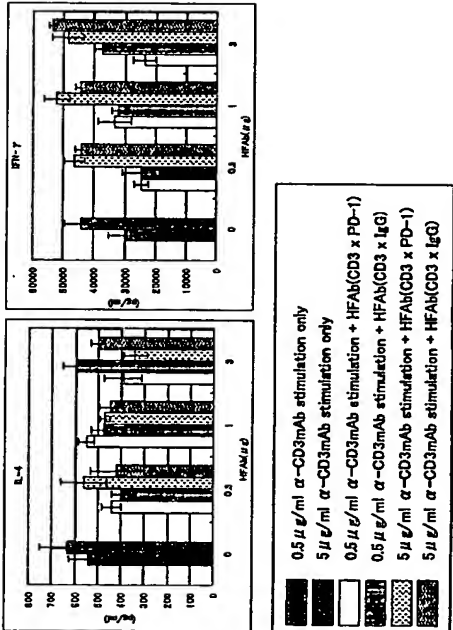


図 3

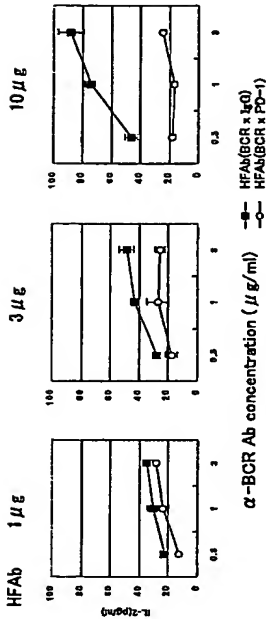
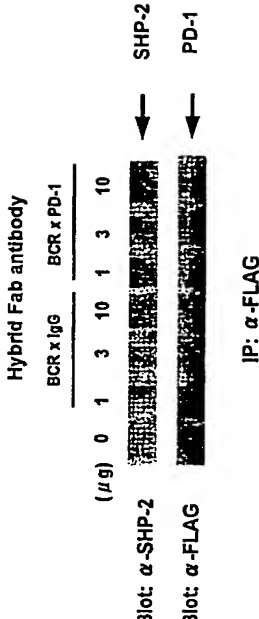
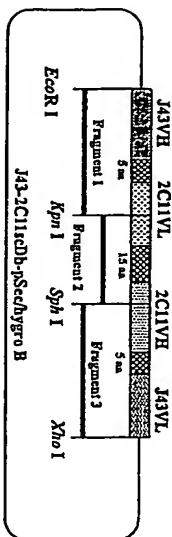


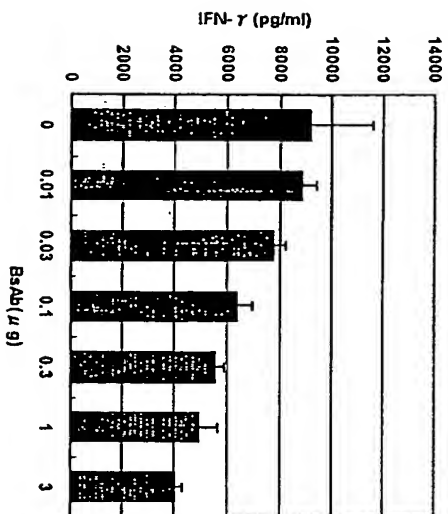
図 4



5



6



SEQUENCE LISTING

- <110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
HONJO, Tsukuba
- <120> Substances which specifically recognize PD-1
- <130> ONO-4210PCT
- <150> JP P2001-232303
- <151> 2001-07-31
- <160> 31
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 1
- Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu
- 1 5 10 15
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Designed DNA based on amino terminal sequence of monoclonal antibody J43 light chain to act as a degenerated primer
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (9)..(9)
- <223> n=a, t, c or g
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (12)..(12)
- <223> n=a, t, c or g

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n=a, t, c or g

<400> 2  
 toygarcna encarcncc

<210> 3  
 <211> 798  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(645)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(642)  
 <223>

<400> 3  
 tat gag cag act cag cca cct tca gca tca gtc aat gta gga gag act  
 Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr  
 1 5 10 15

gtc aaa atc acc tgc tct ggg gac caa ttg ccg aaa tat ttt gca gat  
 Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp  
 20 25 30

tag ttt cat caa agg tca gac cag acc att ttg caa gtg ata tat gat  
 Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Glu Val Ile Tyr Asp  
 35 40 45

gat aat aag cgc ccc tgg ggg atc cct gaa aga atc tct ggg tcc agc  
 Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser  
 50 55 60

tca ggg aca aca gcc acc ttg acc atc aga gat gtc cgg gct gag gat  
 Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp  
 65 70 75 80

gaa ggt gac tat tac tgt ttc tca gga tat att gat agt gat agc aaa

Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys  
 85 90 95  
 ttg tat gtt ttt ggc agc gga acc cag ctc acc gtc cta ggt gga ecc  
 Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro  
 100 105 110  
 aag tct tct ccc aca gtc aca gtg ttt cca cct tca cct gag gag ctc  
 Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu  
 115 120 125  
 cgg aca aac aaa gcc aca ctg gtg tgt ctg gtt aat gac ttc tac cgg  
 Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Asn Asp Phe Tyr Pro  
 130 135 140  
 ggt tct gca aca gtg acc tgg aag gca aat gga gca act atc aat gat  
 Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp  
 145 150 155 160  
 ggg gtg aag act aca aag cct tcc aaa cag ggc caa aac tac atg acc  
 Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly Gln Asn Tyr Met Thr  
 165 170 175  
 agc agc tac cta agt ttg aca gca gac cag tgg aaa tct cac aac agc  
 Ser Ser Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp Lys Ser His Asn Arg  
 180 185 190  
 gtt tcc tgc caa gtt acc aat gaa ggg gaa aat gtg gag aag agt ttg  
 Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 tcc cct gca gaa tgt ctc tagagccca gtcttttct tagccaggga  
 Ser Pro Ala Glu Cys Leu  
 210  
 agctgggagc tacgggacc agaatgtggt ctctctctba tctatcaat ctcaaacctt  
 732  
 ctgctcttac ccactgagta ttcantaaag tctctatagt tautcaaaa aaaaananaa  
 792  
 acaaaa  
 798  
 <210> 4  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4



Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr  
 1 5 10 15  
 Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp  
 20 25 30  
 Trp Phe His Glu Arg Ser Asp Glu Thr Ile Leu Glu Val Ile Tyr Asp  
 35 40 45  
 Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys  
 85 90 95  
 Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro  
 100 105 110  
 Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu  
 115 120 125  
 Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Asn Asp Phe Tyr Pro  
 130 135 140  
 Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Glu Gly Glu Asn Tyr Met Thr  
 165 170 175  
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Glu Trp Lys Ser His Asn Arg  
 180 185 190

Val Ser Cys Glu Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ser Pro Ala Glu Cys Leu  
 210

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Cricetulus migratorius*  
 <220>  
 <221> modified base  
 <222> (1).. (1)  
 <223> phosphorylated

<400> 5  
 cccacagagc cagagcttg a

21

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Cricetulus migratorius*

<400> 6  
 ttgacagctg atccagagct c

21

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Cricetulus migratorius*

<400> 7  
 cgtacgcttg aactctggag c

21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Cricetulus migratorius*

<400> 8

tggttgct gtcacagca g	21	Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	30	35	40
<210> 9		ctg gag tgg gtt gct cac ata tac acg aaa agt tat aat tat gca act			302
<211> 22		Leu Gln Trp Val Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr			
<212> DNA		45	50	55	
<213> Cricetulus migratorius					
<400> 9		tat tac tgg ggt tgg ana ggc aga ttc acc atc tcc aga gat gat			350
tgcaacatt cccatcgtc ct	22	Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp	60	65	70
<210> 10		tcc cga agc atg gtc tcc cta aac atg aac atg aga act gag gac			398
<211> 548		Ser Arg Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp	75	80	85
<212> DNA					90
<213> Mus musculus		acg ggc act tat tac tgt aca aga gat gga agc gga tat ccc tct ctg			446
<220>		Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu	95	100	105
<221> CDS					
<222> (66).. (548)		gat ttc tgg ggt caa ggg acc caa gtc act gtc tcc tca gcc aca aca			494
<223>		Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr	110	115	120
<220>		aca gcc cca tct gtc tat ccc ttg gcc cct gcc tgt gac agc aca acc			542
<221> sig_peptide		Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Ala Cys Asp Ser Thr Thr	125	130	135
<222> (66).. (128)					
<223>					
<220>		aaa tgg			548
<221> mat_peptide		Lys Ser			
<222> (129).. (548)		140			
<223>					
<400> 10		<210> 11			
ggagcagag gactctagcc cigtcttccc attcagtgg cagcactgaa aacagacca	60	<211> 161			
tcac atg gga tgg gga ctg cag tgg gtt ttc ttt gtt gct ctt tta aaa	110	<212> PRT			
Met Gly Leu Gly Leu Gln Trp Val Phe Phe Val Ala Leu Leu Lys		<213> Mus musculus			
-20					
ggt gtc cac tgt gag gtc cgt ctt ctg gag tct ggt gga gga tta gtc	158	<400> 11			
Gly Val His Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val		Met Gly Leu Gly Leu Gln Trp Val Phe Phe Val Ala Leu Leu Lys Gly	-20	-10	
-5					
agc cct gag ggg tca ctg aaa ctc tcc tgt gtc gcc tct gga ttc acc	205				
Lys Pro Glu Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr					
15					
ttc agt gac tat ttc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg	254				

15 20 25

Ser Asp Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
30 35 40

Glu Trp Val Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr  
45 50 55

Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
60 65 70 75

Arg Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr  
80 85 90

Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp  
95 100 105

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr  
110 115 120

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Ala Cys Asp Ser Thr Thr Lys  
125 130 135

Ser  
140

<210> 12  
<211> 21

<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 12  
gggtgcagc tggtaggtc t

21

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 13  
tggtaggtc tggtaggtc tt

22

<210> 14  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 14  
ggatccagc tggtaggtc tc

22

<210> 15  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 15  
ttgattacc agcttgggtgc cag

23

<210> 16  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 16  
tttgattacc gggtgcagc ttctgggtc t

31

<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 17  
gattggagc tttagagct tcc

23

<210> 18  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 18  
cagccagtc aggcattag caa

23

<210> 19  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
  
<400> 19  
taatgatgc gaccgaatcc agc

23

<210> 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 20  
tgaggacctt ggatccaact tca

23

<210> 21  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 21  
aauaanaac tcgaggacct aggcagtg gctggst

37

<210> 22  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of J43 and the light chain of 145-2C11

<400> 22  
aggagccca gtaactgtct ctcaggttg aggcgttca gcatccaga tgaaccagtc  
tcaat

60

65

<210> 23  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

60

10/24

<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of J43 and the light chain of 145-2C11

<400> 23  
tccctgggtt cagtgacaga ggagttccacc tcgccaagt ctgtaggtct actgsgtcag  
aggta

60

65

<210> 24  
<211> 95  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy and light chains of 145-2C11

<400> 24  
acctggcacc aagctggaaa tcaaggttg aggcgttca ggcggagtg gctctggcgg  
tggcggatcg gaggtcagc tggtaggagtc tgggg

60

95

<210> 25  
<211> 95  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy and light chains of 145-2C11

<400> 25  
tggacagtg ttgaacctt agtttccacc tcgccaagt cagctccac cggagcgcgc  
accgctcag ctcacgctcg accacctcag acccc

60

95

<210> 26  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of 145-2C

11/24

## 11 and the light chain of J43

<400> 26  
agagacatg gtacacgtct cctcaggttg aggcgttca tatgagcga ctacgacac 60  
ttcag 65  
<210> 27  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of 145-2C  
11 and the light chain of J43  
<400> 27  
tccttgatc cagtgcacag agagtcacac tcacgcagat atactcgact gattcgttgg 60  
aagtc 65  
<210> 28  
<211> 1437  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Designed DNA to produce the bispecific antibody  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1437)  
<223>  
<400> 28  
aag atg cgg att cag gag tct ggt gga gga tta atg aag cct gag ggg 48  
Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly 1  
1 5 10 15  
tca cgg aag ctc tcc tgt atg gcc tct aga ttc acc ttc agt gac tat 96  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr 20  
20 25 30  
ttc atg agc tgg atc cgc cag gct cca ggg aag ggg atg aag tgg gtt 144  
Phe Met Ser Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35  
35 40 45

gct cac ata tuc acg aua agt tat aat tat gca acc tac tac tgg ggt 192  
Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Ser Gly 50  
50 55 60  
tcg atg aaa ggc aga ttc acc atc tcc aga gat gat tcc cga agc atg 240  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Met 65  
70 75 80  
gtc tac ctc caa atg aac aac ctc aga act gag ggc aag ggc act tat 288  
Val Tyr Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr 85  
90 95  
tac tgt aca aga gat gga agc gga tat ccc tct ctc gat ttc tgg ggt 336  
Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly 100  
105 110  
caa ggg acc caa gtc act gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca gac atc 384  
Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile 115  
120 125  
cag atg acc cag tct cca tca ctc ctc gtc tcc ctc gga gac aga 432  
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg 130  
135 140  
gtc act atc aat tgt cag gcc agt cag gcc att agc aat tat tta aac 480  
Val Thr Ile Asn Cys Glu Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn 145  
150 155 160  
tgg tac cag cag aua cca ggg aua gct cct aag atc atc tat tat 528  
Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr 165  
170 175  
aca aat aaa ttc gca gat gga gtc cca tca agt ttc agt ggc agt ggt 576  
Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly 180  
185 190 195  
tct ggg aga gat tct tct ttc act atc ago agc atg gaa tcc gaa gat 624  
Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp 195  
200 205  
att aga tat tat tac tgt caa cag tat tat aac tat cag tgg agc ttc 672  
Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Glu Glu Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe 210  
215 220  
gga cct ggc acc aag atg gga atc aaa ggt gga ggc ggt tca ggc gga 720  
Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly 225  
230 235 240

gat ggc tct ggc ggc cag cgt ggc ggc cag cgt ggc ggc tct ggc Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Val Gln Leu Val Gly Ser Gly 245 250 255	768	agc tca ggc aca aca gcc acc ttg acc atc aga gat gtc cgg gct gag Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Gly 435 440 445	1344
gaa ggc ttg ggc cgt ggc aag tcc ctg aca ctc tcc tgt gag gcc Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Gly Ala 260 265 270	816	gat gaa ggt gac tat tac tgt ttc tca gga tat gtt gat agt gat agc Asp Gly Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser 450 455 460	1392
tct gga ttc acc ttc agc ggc tat ggc atg cnc tgg gtc cgc cag gct Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala 275 280 285	864	aaa ttg tat gtt ttt ggc agc gga acc cag ctc acc gtc cta ggt Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly 465 470 475	1437
cca ggc agc ggc ctg ggc tgc gtc gca tac att act agt agt agt att Pro Gly Arg Gly Leu Gly Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ile 290 295 300	912	<210> 29 <211> 479 <212> PRT <213> Artificial Sequence	
aat atc aaa tat gct ggc gct ggc aaa ggc cgg ttc acc gtc tcc aga Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg 305 310 315	960	<220> <223> Designed DNA to produce the bispecific antibody	
gac aat gcc aag aac tta ctg ttt cta caa atg aac att ctc aag tct Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser 320 325 330	1008	<400> 29	Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15
gag gac aca gcc atg tac tct gca aga ttc gac tgg gac aaa aat Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn 340 345 350	1056		Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr 20 25 30
tac tgg ggc caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca ggt ggc ggt Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly 355 360 365	1104		Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45
tca tat gag ctg act cag cca cct tca gca tca gtc aat gta ggc gag Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Gly 370 375 380	1152		Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly 50 55 60
act gtc aaa atc acc tgc tct ggc gac caa ttg ccg aaa tat ttt gca Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala 385 390 395	1200		Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Arg Ser Met 65 70 75 80
gat tgg ttt cat caa agg tca gac cag acc att ttg caa gtc ata tat Asp Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr 405 410 415	1248		Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr 85 90 95
gat gat aat aag cgc ccc tgg ggc atc cct gaa aga atc tct ggc tcc Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser 420 425 430	1296		

W003M1911

PCT/JPN207735

W003M1911

PCT/JPN207735

Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly  
100 105 110

Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ile  
290 295 300

Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
115 120 125

Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg  
305 310 315 320

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg  
130 135 140

Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser  
325 330 335

Val Thr Ile Asn Cys Glu Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
145 150 155 160

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn  
340 345 350

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr  
165 170 175

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
355 360 365

Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
180 185 190

Ser Tyr Glu Leu Thr Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu  
370 375 380

Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp  
195 200 205

Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala  
385 390 395 400

Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Glu Glu Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe  
210 215 220

Asp Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr  
405 410 415

Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
225 230 235 240

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser  
420 425 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly  
245 250 255

Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu  
435 440 445

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala  
260 265 270

Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser  
450 455 460

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala  
275 280 285

Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
465 470 475

16/24

17/24

<210> 30  
 <211> 1656  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Designed protein to act as the bispecific antibody

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (1656)  
 <223>

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1).. (63)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (64).. (1653)  
 <223>

<400> 30  
 atg gag aca gac aca ctc cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Thr  
 -20 -15 -10

ggt tcc act ggt gac ggc cag cag ggc agc ggc ggc cgt acg  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr  
 -5 -1 1 5 10

aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc ccc ggg ctg cag gaa ttc gag gtg  
 Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Glu Val  
 15 20 25

cgg ctt ctg gag tct ggt gga gga tta gta aag cct gag ggc tca ctg  
 Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu  
 30 35 40

aaa ctc tcc tgt gtg gcc tct gga ttc acc ttc agt gac tat ttc atg  
 Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met  
 45 50 55

agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtt gct cac  
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His  
 60 65 70 75

18/24

ata tac acg aaa agt tat aat tat gca act tat taa tgg ggt tgg gtg  
 Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Ser Gly Ser Val  
 80 85 90

aaa ggc aga ttc acc atc tcc aga gat tcc cga agc atg gtc tac  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Arg Ser Met Val Tyr  
 95 100 105

ctg caa atg aac aac ctg aga act gag gac agc gcc act tat tac tgt  
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 110 115 120

aca aga gat gga agc gga tat ccc tct ctg gat ttc tgg ggt caa ggc  
 Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 125 130 135

acc caa gtc act gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca gac atc cag atg  
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met  
 140 145 150 155

acc cag tct cca tca tca ctg cct gcc tcc ctg gga gac aga gtc act  
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr  
 160 165 170

atc aat tgt cag gcc agt cag gac att agc ant tat tta aac tgg tac  
 Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 175 180 185

cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctg ctg atc tat tat aca aat  
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn  
 190 195 200

aaa ttg gca gat gga gtc cca tca agg ttc agt gac agt ggt tct ggc  
 Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 205 210 215

aga gat tct tct ttc act atc agc agc ctg gaa tcc gaa gat att gga  
 Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly  
 220 225 230 235

tct tat tac tgt caa cag tat tat aac tat cag tgg aag ttc gaa cct  
 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro  
 240 245 250

ggc acc aag ctg gaa atc aaa ggt gga agc agt tca ggc ggc ggt ggc  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 255 260 265

19/24



tct ggc ggc ggc ggc tgc ggc ggc ggc ctc ggc ggc tct ggc ggc ggc 912  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 270 275 280  
 ttc ggc cgc cct ggc ggc tcc ctc ggc ggc tcc tgc ggc ggc tct ggc 960  
 Leu Val Glu Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly 285 290 295  
 ttc acc ttc agc ggc tat ggc atg cnc tgc gtc cgc cgc ggc cca ggc 1008  
 Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly 300 305 310 315  
 ggc ggc ctc ggc tgc gtc gca tcc att act agt agt agt att att atc 1056  
 Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ile Asn Ile 320 325 330  
 aca tat gct gac gct gtc ggc ggc ggc ttc acc gtc tcc agc gac aat 1104  
 Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn 335 340 345  
 ggc ggc acc tta ctc ttt cta cca atg acc att ctc acc tct ggc ggc 1152  
 Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Glu Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp 350 355 360  
 acc ggc atg tcc tcc tgc gca gca ttc gac tgc ggc ggc aca aat tcc tgc 1200  
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp 365 370 375  
 ggc cca ggc acc atg gtc acc gtc tcc tca ggc ggc ggc tca tat 1248  
 Gly Glu Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Tyr 380 385 390 395  
 ggc atg aat cag cca cct tca gca tca gtc aat gta ggc ggc act gtc 1296  
 Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr Val 400 405 410  
 aca atc acc tgc tct ggc ggc cca tat ttc cgc ggc tgc tgc 1344  
 Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp Trp 415 420 425  
 ttt cct cca ggc tca ggc cag acc att ttc cca gtc ata tat ggc aat 1392  
 Phe His Glu Arg Ser Asp Glu Thr Ile Leu Glu Val Ile Tyr Asp Asp 430 435 440  
 aat ggc ggc ccc tgc ggc atc cct ggc ggc acc tct ggc tcc agc tca 1440  
 Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser Ser 445 450 455

20/24

ggc aca acc ggc acc ttc acc atc aga gat gtc cgc ggc ggc gat gaa 1488  
 Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp Glu 460 465 470 475  
 ggc tat tcc tgc ttc tca ggc tat gtc gat agt gat agc aca ttc 1536  
 Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys Leu 480 485 490  
 tat gtc ttt ggc agc ggc acc acc ctc acc gtc cta ggc cct cga ggc 1584  
 Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly Pro Arg Gly 495 500 505  
 ggc ccc ggc cca aca ctc atc tca ggc ggc ggc ctc gat agc ggc gtc 1632  
 Gly Pro Glu Glu Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val 510 515 520  
 ggc cat cat cat cat cat cat tga 1656  
 Asp His His His His His 525 530  
 <210> 31  
 <211> 551  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Designed protein to act as the bispecific antibody  
 <400> 31  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 -20 -15 -10  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Glu Pro Ala Arg Arg Ala Arg Thr  
 -5 -1 1 5 10  
 Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Pro Gly Leu Glu Glu Phe Glu Val  
 15 20 25  
 Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu  
 30 35 40  
 Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met

21/24

45 50 55

240 245 250

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His  
60 65 70 75

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
255 260 265

Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val  
80 85 90

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
270 275 280

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Met Val Tyr  
95 100 105

Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly  
285 290 295

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
110 115 120

Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
300 305 310 315

Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
125 130 135

Arg Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile  
320 325 330

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met  
140 145 150 155

Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn  
335 340 345

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr  
160 165 170

Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Glu Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp  
350 355 360

Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr  
175 180 185

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp  
365 370 375

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn  
190 195 200

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Tyr  
380 385 390 395

Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
205 210 215

Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr Val  
400 405 410

Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly  
220 225 230 235

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp Trp  
415 420 425

Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro  
235 240 245

Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr Asp Asp  
245 250 255

WO 03/011911

PCT/JP02/0735

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/0735

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> C07K16/46, A61P31/02, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06,  
C07K19/00//A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELD(S) SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C07K16/46, A61P31/02, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06,  
C07K19/00, A61K38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI/BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
P, X	OKAZAKI T. et al., PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2001, Vol. 98, No. 24, pages 13866 to 13871	1-25
A	JP 7-291996 A (Tasaku HONJO), 07 November, 1995 (07.11.95), Full text & EP 670369 A2 & US 5698520 A	1-25
A	Freeman G. J. et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, J. Exp. Med., 2000, Vol. 192, No. 7, pages 1027 to 1034	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family matrix.

* Special categories of cited documents: "X" document defining the present state of the art which is not considered to be of particular relevance "P" earlier document but published on or after the international filing date "T" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other activity "F" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "F" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other cited documents, each such document being cited to provide evidence to a person skilled in the art that the claimed invention is not novel or does not involve an inventive step when the document is taken alone
Date of the actual completion of the international search 26 September, 2002 (26.09.02)	Date of mailing of the international search report 08 October, 2002 (08.10.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

24/24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/07735
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NISHIMURA H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol.10, No.10, Pages 1563 to 1572	1-25

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/07735
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C1. C07K16/46, A61P31/02, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06, C07K19/00 // A61K 38/00		
B. 図表を行った分類 図表を行った発明の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C1. C07K16/46, A61P31/02, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06, C07K19/00, A61K 38/00		
最小组要料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用したデータベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI/BIOSIS(DIALOG), JICST (JOIS) MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献	引用文献名 及び一部の前記が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリ-*	Okazaki T. et al., PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol. 98, No. 24, pages 13866-13871	1-25
A	JP 7-291996 A (本原稿) 1995.11.07, 全文 & EP 670369 A2 & US 5629204 A & US 5698520 A	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の並びにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 * 引用文献のカテゴリ- 「A」 特許に関連のある文献ではなく、一般技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に基礎を構成する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特許性理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による提示、使用、展示等に及ぼす文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は発明の図解のために引用するもの 「X」 特許に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特許に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当該文献によって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26.09.02		国際調査報告の発送日 08.10.02
国際調査機関の名称及び宛て先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区豊田三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (発明のある職員) 本岡 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第 2 ページ) (1998 年 7 月)

C (特許) 引用文献の サマリー*	記載すると認められる文献	記載する 請求の範囲の番号
A	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の提示 Preeman G. J. et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, J. Exp. Med., 2000, Vol. 192, No. 7, pages 1027-1034	1-25
A	Nishimura H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol. 10, No. 10, pages 1563-1572	1-25

This Page Blank (uspo)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)